© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Diversität und Phylogenie der Protisten – aufgedeckt mit molekularen Merkmalen

M. SCHLEGEL

Abstract

Diversity and Phylogeny of Protists – Discovered with Molecular Characters.

Molecular characters are gaining increasing importance in biological systematics. To date, the most often used molecular character for phylogenetic analyses is the coding region of the small subunit RNA (SSU-rDNA). In the trees based on SSU-rDNA sequence comparisons amitochondriate taxa branch first, including species of the microsporeans, parabasaleans, and diplomonads. The next branches lead to the euglenozoans, heteroloboseans, and dictyostylids. Subsequently, a rapid ramification leads to the red algae, chlorobionts (green algae, mosses, and vascular plants), fungi, metazoans and choanoflagellates. Also included in this "radiation" are the stramenopiles (oomycetes, hyphochitriomycetes and heterokont algae), alveolates (ciliates, apicomplexans, and dionoflagellates), cryptomonads, and parts of the amoebae. The parasitic myxozoans are branching within the metazoa. However, they do not group with the cnidarians, as suggested by ultrastructural similarities.

Comparisons of protein coding genes support a sistergroup relationship of metazoans and fungi. Protein gene- and rDNA-trees are in conflict with regard to the positions of *Entamoeba histololytica*, *Dictyostelium discoideum*, and the microsporans, the latter branching in the radiation with the fungi. However, the analysis of different protein coding genes yields also different results: a- and b- tubulin genes support a close relationship with fungi, whereas sequence comparisons of an elongation factor (EF 1-a) are in agreement with the ribosomal data. These conflicting results might be caused by extremely different substitution rates in different lineages. Especially parasites tend to have fast evolving genes, which may lead to wrong topologies, a phenomenon also known as "long branch artefact".

Another reason might be that ramification occurred in relatively short time intervals wherein not enough molecular apomorphies evolved and thus, the inner segments of the tree cannot be reconstructed confidently. The shorter the time intervals are, the more variable nucleotide positions are needed in order to resolve the inner nodes. Besides the quantitative sequence comparisons qualitative character analyses should be given more weight, such as gene rearrangements, insertions, deletions, and duplications. As an example, character differences between the histone H4 genes of ciliates are analysed according to the principles of phylogenetic systematics.

Stapfia 56,
zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums, Neue Folge Nr. 131 (1998), 105-118

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

1 Einleitung

Einzellige Eukaryoten (Protisten) werden seit mehr als 300 Jahren mit Begeisterung studiert. Insbesondere Ernst HAECKEL hat ihre Formenvielfalt und Schönheit untersucht und beschrieben (HAECKEL 1904 und viele andere Veröffentlichungen). Um ihrer taxonomischen Bedeutung Rechnung zu tragen, hat er als erster bereits 1866 ein eigenes Reich Protista eingeführt (siehe den Beitrag von CORLISS in diesem Band) und sich erstmals intensiv mit ihrer Stammesgeschichte auseinandergesetzt (HAECKEL 1866).

Protisten weisen neben ihrer hohen morphologischen, physiologischen und biochemischen Diversität eine enorme, vor allem mit dem Elektronenmikroskop aufgedeckte strukturelle Komplexität auf (RAGAN & CHAPMAN 1978; ROTHSCHILD & HEYWOOD 1987; MARGULIS et al. 1989). Dies hat ihre Ursache vielleicht darin, daß alle Lebensprozesse von einer einzigen Zelle bewerkstelligt werden müssen. Neben der Entdeckung neuer ultrastruktureller Merkmale und deren funktioneller Analyse ergab sich aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen auch, daß die Flagellata (Mastigophora) und Sarcodina (Rhizopoda) ein polyphyletisches Sammelsurium darstellen. Die Rekonstruktion der Phylogenie der Protisten, sowie ihrer Verwandtschaftsbeziehungen zu den vielzelligen Eukaryoten gelang jedoch bislang nicht. Erst mit Hilfe zusätzlicher, molekularer Merkmale beginnt sich ein Bild der Stammesgeschichte der Protisten abzuzeichnen, das bereits in neueren Klassifikationen berücksichtigt wird (HAUSMANN & HÜLSMANN 1996a, b). Im folgenden werden die phylogenetischen Beziehungen der Protisten untereinander und zu den vielzelligen Eukaryoten, wie sie sich aus der Analyse molekularer Daten ergeben dargelegt, sowie die Grenzen der derzeitig verwendeten Merkmale und Methoden diskutiert.

2 Molekulare Merkmale

Der Einsatz molekularer Merkmale war zunächst aufgrund des hohen technischen und experimentellen Aufwandes sehr begrenzt. Durch die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (INNIS et al. 1990), mit der gezielt DNA-Sequenzen aus geringen Mengen genomischer DNA in vitro vervielfältigt und weiter untersucht werden können, änderte sich die Situation schlagartig. Innerhalb von zehn Jahren ist die Zahl der sequenzierten Gene sprunghaft angewachsen. Die umfangreichste Datenbasis gibt es mittlerweile für die codierende Region der RNA der kleinen Ribosomenuntereinheit (small subunit rRNA, SSU-rRNA): mehr als 6000 komplette, davon etwa 1600 eukaryotische Sequenzen sind veröffentlicht (http://rrna.uia.ac.be, 324 Archäbakterien, 5484 Eubakterien und 1581 Eukaryoten).

Die vollständige codierende Region der großen rRNA (large subunit rRNA, LSU-rRNA) wird ebenfalls zunehmend für die Analyse phylogenetischer Probleme herangezogen. Es liegen jedoch bislang weit weniger Sequenzen vor als von der SSU-rDNA (356, davon 23 Archäbakterien, 161 Eubakterien und 72 Eukaryoten). Im wesentlichen ergibt die Untersuchung der LSU-rRNA dasselbe Bild wie die hier näher besprochenen SSU-rRNA Sequenzvergleiche (DE RIJK et al. 1995). Lediglich die Analyse partieller Sequenzen der LSU-rRNA führt zu stark abweichenden und schwer nachvollziehbaren Stammbäumen (PAWLOWSKI et al. 1994).

Ein Problem beim Vergleich von Sequenzen ist die korrekte Homologisierung von Nukleotidpositionen zwischen den verglichenen Sequenzen ("alignment"). Im Falle der rDNAs wird diese Homologisierung durch im Gen verteilte hochkonservierte Abschnitte und durch die Berücksichtigung der Sekundärstruktur erleichtert. Hochvariable Bereiche werden zudem bei Vergleichen zwischen Sequenzen entfernt verwandter Taxa eliminiert, um das Verhältnis von phylogenetischem Signal zu uninformativem Rauschen (durch multiple Substitutionen gesättigte Positionen) zu verbessern (ELWOOD et al. 1985).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

3 Sequenzvergleiche der SSU-rRNA

Die Sequenzunterschiede in der SSU-rRNA eukaryotischer Protisten übertreffen sowohl die aller Prokaryoten, als auch die aller vielzelligen eukaryotischen Taxa (Abb. 1). Ein zusammenfassendes Bild der Protistenphylogenie, wie sie sich aus der Sequenzanalyse mit Hilfe von Distanz Matrix und Maximum Parsimony Methoden darstellt, zeigt Abbildung 2 (aus LEIPE & HAUSMANN 1993, modifiziert).

3.1 Frühe Abzweigungen im Stammbaum der Eukaryoten

An der Basis des Eukaryoten-Stammbaumes zweigen Vertreter einer Reihe artenarmer Taxa ab, die Microsporidia, Diplomonadida und Parabasalea. Sie besitzen alle keine Mitochondrien. Die rRNA-Sequenzanalysen konnten die genaue Abfolge der Aufzweigungen innerhalb dieser mitochondrienlosen Gruppen nicht 100%ig auflösen (LEIPE et al. 1993). Da alle hier abzweigenden Organismen entweder Parasiten sind oder in anderen sauerstoffarmen Milieus vorkommen, hatte man lange angenommen, daß sie ihre Mitochondrien als Anpassung an solche Lebensräume verloren hätten. Endgültig ist diese Frage jedoch noch nicht geklärt und durch neue Untersuchungen an Hitzeschockproteinen in jüngster Zeit verstärkt in der Diskussion (BUI et al. 1996). Trichomonaden (Vertreter der Parabasalea) besitzen Hydrogenosomen, ein ungewöhnliches, von einer Doppelmembran umhülltes Organell, das am Kohlehydratabbau beteiligt ist. Pyruvat wird zu Acetat, CO_2 und molekularem Wasserstoff abgebaut. Hierbei wird ATP durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen. Das an der Decarboxylierung beteiligte Enzym (Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreductase) und das Schlüsselenzym Hydrogenase sind ebenfalls bei anaeroben Bakterien weit verbreitet. Die innere Membran ist nicht gefaltet und besitzt keine nachweisbaren Mengen von Cytochromen und Cardiolipin. Es wird deshalb von manchen Autoren angenommen, daß die Hydrogenosomen nicht mit den Mitochondrien homolog sind, sondern unabhängig aus einem anaeroben Bakterium entstanden sind (MÜLLER 1993). Andere Autoren gehen jedoch von einem gemeinsamen evolutiven Ursprung der beiden Organelle aus (CAVALIER-SMITH 1992). So wird z. B. die ATP-Synthese bei beiden durch die Succinyl-CoA Synthase katalysiert (BUI et al. 1996 und darin). Zudem wurden durch Hybridisierungsexperimente Hitzeschockproteine in den Hydrogenosomen lokalisiert, die in einigen Merkmalen mit mitochondrialen Hitzeschockproteinen übereinstimmen. Sie weisen z. B. ähnliche „Leader"-Sequenzen auf, die für den Import in die Mitchondrien wichtig sind. Es kommen identische Sequenzmotive vor („Signature"-Sequenzen), die man als Synapomorphien deuten kann. In Stammbaumanalysen gruppieren die Hydrogenosomenproteine zusammen mit den Mitochondrien-Hitzeschockproteinen (BUI et al. 1996). Somit erhält derzeit die Hypothese, daß beide Organelle einen gemeinsamen Vorfahr haben, stärkere Unterstützung als bisher.

Als erste im Stammbaum der Eukaryoten könnten die Vorfahren der Mikrospora abgezweigt sein, da sie eine Reihe weiterer, als ursprünglich interpretierbare Merkmale aufweisen. Sie haben eine sehr kurze rRNA. So weist z. B. *Vairimorpha necatrix* eine Länge von 1255 Basenpaaren auf. Es fehlen eukaryotentypische Loops (VOSSBRINCK et al. 1987; WOLTERS 1991) und die 5,8 S rRNA

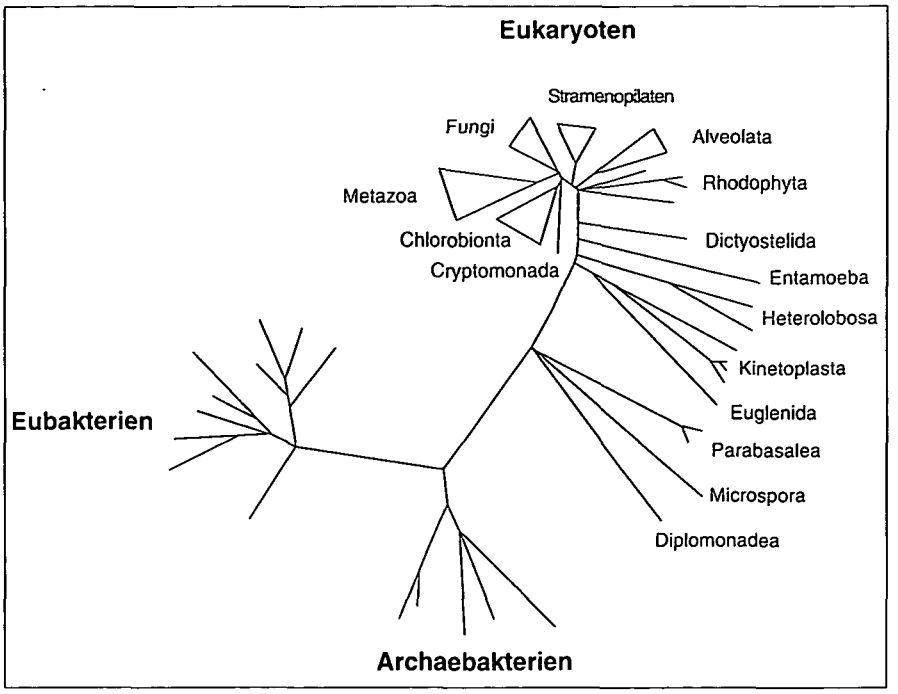


Abb. 1: Distanz-Matrix-Phänogramm der Archaebakterien, Eubakterien und Eukaryoten, basierend auf dem Sequenzvergleich der SSU-rRNA. Die Länge der Äste entspricht der genetischen Distanz. Die anhand der ermittelten Sequenzunterschiede geschätzten genetischen Distanzen der Protisten übertreffen sowohl die der Prokaryoten, als auch die aller vielzelligen Taxa. Verändert und ergänzt nach SOGIN (1991).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

(VOSSBRINCK & WOESE 1986). Außer den Mitochondrien fehlen Golgi-Apparat, Cytoskelett und 9+2-Flagellen. In ultrastrukturellen Untersuchungen von Mikrosporidiern konnten jedoch für die Meiose typische synaptonemale Komplexe nachgewiesen werden (HÜLSMANN & HAUSMANN 1994). „Sex" (im Sinne von Genaustausch) gehörte demnach zum Grundplan der Eukaryoten.

Zu den nächsten Ästen im Stammbaum gehören die Euglenozoa, sowie verschiedene Taxa der „alten" Amöben: „Amöboflagellaten" (*Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Tetramites*), die azellulären Schleimpilze (Physarales), sowie die zellulären Schleimpilze (Dictyostelidae). Eine Art, *Entamoeba histolytica*, scheint ihre Mitochondrien sekundär wieder verloren zu haben, da hier ebenfalls ein mitochondrienspezifisches Chaperonin (CPN 60) entdeckt wurde (CLARK & ROGER 1995). Die Euglenozoa sind mit etwa 200 Arten die größte Gruppe, die in dieser „mittleren Stammbaumebene" abzweigt. Zu ihnen gehören die heterotrophen Kinetoplasta und die zum Teil autotrophen Euglenida. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben aber gezeigt, daß ihre Plastiden nicht von zwei, sondern von drei Membranen umgeben sind. Diese Plastiden haben außerdem die gleichen Chlorophylle wie die Chlorobionta (a und b). Somit handelt es sich wohl bei diesen Symbionten nicht primär um Prokaryoten, sondern um die Reste eines eukaryotischen Endobionten, nämlich einer Grünalge. Da die Grünalgen später in der Stammesgeschichte der Eukaryoten entstanden, müssen auch die autotrophen Eugleniden eine späte Entwicklung sein. Daraus kann man schließen, daß die Euglenozoa ursprünglich eine heterotrophe Gruppe waren.

3.2 Multiple Aufspaltungen in der späteren Eukaryotenphylogenie

Neben den vielzelligen Tieren, Pflanzen und „höheren" Pilzen findet sich hier eine ganze Reihe weiterer Taxa, deren engere Verwandtschaftsbeziehungen erst durch die Sequenzvergleiche erkannt wurden. Vor allem im englischen Sprachraum hat sich hierfür der unglückliche Ausdruck „Kronengruppe" (crown group) eingebürgert, der jedoch in der Systematik anders definiert ist (JEFFERIES 1980; SUDHAUS & REHFELD 1992), nämlich als das überlebende Taxon einer ausgestorbenen Stammlinie. Eine Kronengruppe im Sinne von JEFFERIES wäre somit das Taxon Eukaryota.

Die genaue Abfolge der Aufspaltungen läßt sich jedoch mit den ribosomalen Daten bislang nur zum Teil bestimmen. Vielleicht haben sich diese in erdgeschichtlichen Maßstäben kurzen Zeitabständen vollzogen, so daß sich nicht genügend Mutationen ereignet und damit Sequenzunterschiede evolviert haben, die eine Rekonstruktion dieser inneren Segmente des Baumes ermöglichen (s. u.). Ein Monophyllum stellen die Metazoa, Choanoflagellata und Pilze dar (WAINRIGHT et al. 1993), das von CAVALIER-SMITH als Ophistokonta bezeichnet wird (CAVALIER-SMITH & CHAO 1997). Weitere Merkmale sprechen für eine nähere Verwandtschaft von Pilzen und Tieren. Bei beiden kommt Chitin vor, sie verwenden als Speicherstoff Glycogen im Gegensatz zu Stärke und im mitochondrialen genetischen Code wird UGA für Tryptophan verwendet, während es bei Pflanzen für Stop codiert.

Bei den verbleibenden Taxa wurden erst durch die Sequenzvergleiche die Verwandtschaftsbeziehungen ultrastrukturell gut begründeter, aber isoliert stehender Taxa erkannt (LEIPE & HAUSMANN 1993). Die Alveolata umfassen die Dinoflagellata, überwiegend Photosynthese betreibende Arten und wenige Parasiten (sie wurden früher aufgrund des offensichtlichen Fehlens von Histonen als besonders primitive Eukaryoten betrachtet), die Apicomplexa, eine Gruppe, die durchweg endoparasitische Arten enthält und die nur noch im Zusammenhang mit der sexuellen Fortpflanzung begeißelte Stadien aufweisen. Diese beiden stellen nach den Sequenzdaten die Schwestergruppe der primär phagotrophen Ciliophora dar. Diese drei Taxa sind in ihrer Feinstruktur und ihren ökologischen Ansprüchen derart verschieden, daß ihre Zusammengehörigkeit vor den Sequenzvergleichen zwar diskutiert (TAYLOR 1976), aber nicht anerkannt wurde, obwohl es schon vorher auch ultrastrukturelle Hinweise gab,

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

nämlich die submembranösen Alveolen, die dieser Gruppe ihren Namen gaben (CAVALIER-SMITH 1993).

Im Fall der Stramenopilaten stützen die Sequenzdaten eine vor allem auf der Flagellenmorphologie basierende Gruppierung (PATTERSON 1989). Auf der Membranoberfläche befinden sich insbesondere auf einer der beiden Flagellen dünne, dreigeteilte Haare oder davon abgeleitete Bildungen des Golgiapparates. Neben den heterokonten Algen gehören die Oomyceten und Hyphochytriomyceten in diese Gruppe (LEIPE et al. 1994). In den Stammbäumen gruppieren die Alveolaten mit den Stramenopilaten, allerdings mit schwacher bootstrap-Unterstützung (WOLTERS 1991; VAN DE PEER et al. 1993; WAINRIGHT et al. 1993; LEIPE et al. 1994).

Dieser Bereich des Stammbaums enthält noch weitere Sequenzen: die Kern rRNAs der Cryptomonaden zusammen mit den Chlorobionten und Teile der früheren „Amöben". Es sind dies die bakterienfressenden lobosen „Limax-Amöben" (*Acanthamoeba castellani*, *Hartmanella vermiformis*) und filose Amöben (*Euglypha rotunda* und *Paulinella chromatophora*). Letztere stellen womöglich eine unabhängige Evolutionslinie dar, die auch Vertreter der rhizopodialen Gattung *Chlorarachnion* enthalten (BHATTACHARYA et al. 1995).

3.3
Phylogenie der Myxozoa

Die Myxozoa sind eine rein parasitische Gruppe von Eukaryoten, die sowohl ein- bis mehrkernige trophische Stadien, als auch mehrzellige Sporen ausbilden. Ihre systematische Zugehörigkeit ist seit langem umstritten. Anhand ultrastruktureller Übereinstimmungen in den Polfäden wurde eine Verwandtschaft zu den Cnidariern, und hierbei zu den Hydrozoa (Narcomedusae) vermutet (LOM 1989). In den bisherigen Sequenzanalysen gruppieren die Myxozoa tatsächlich mit den Metazoa (SMOTHERS et al. 1994; SCHLEGEL et al. 1996; SIDDAL et al. 1996). Allerdings wird die Verwandtschaft zu den Cnidaria, und zwar zu *Polypodium hydriforme* (Narcomedusae) in nur einer der drei Untersuchungen bestätigt (SIDDAL et al. 1996). In den anderen Arbeiten, gruppieren die Myxozoa überraschenderweise zu den Bilateria (Abb. 3). Die bislang untersuchten Sequenzen der Myxozoa, sowie von *Polypodium hydriforme* zeigen jedoch eine hohe Substitutionsrate, wie dies bei Parasiten häufig der Fall ist. Die phylogenetische Analyse schnell evolvierender Sequenzen ist oft problematischer als die langsamer evolvierender, da die Zahl multipler Substitutionen erhöht wird. Dadurch häufen sich Konvergenzen und Analogien an, die zu falschen Gruppierungen führen (FELSENSTEIN 1978; WOLTERS 1991; VAN DE PEER et al. 1996a). Die Stammbäume in der Arbeit, in der die Myxozoen-Sequenzen zusammen mit *Polypodium* abzweigen, weisen

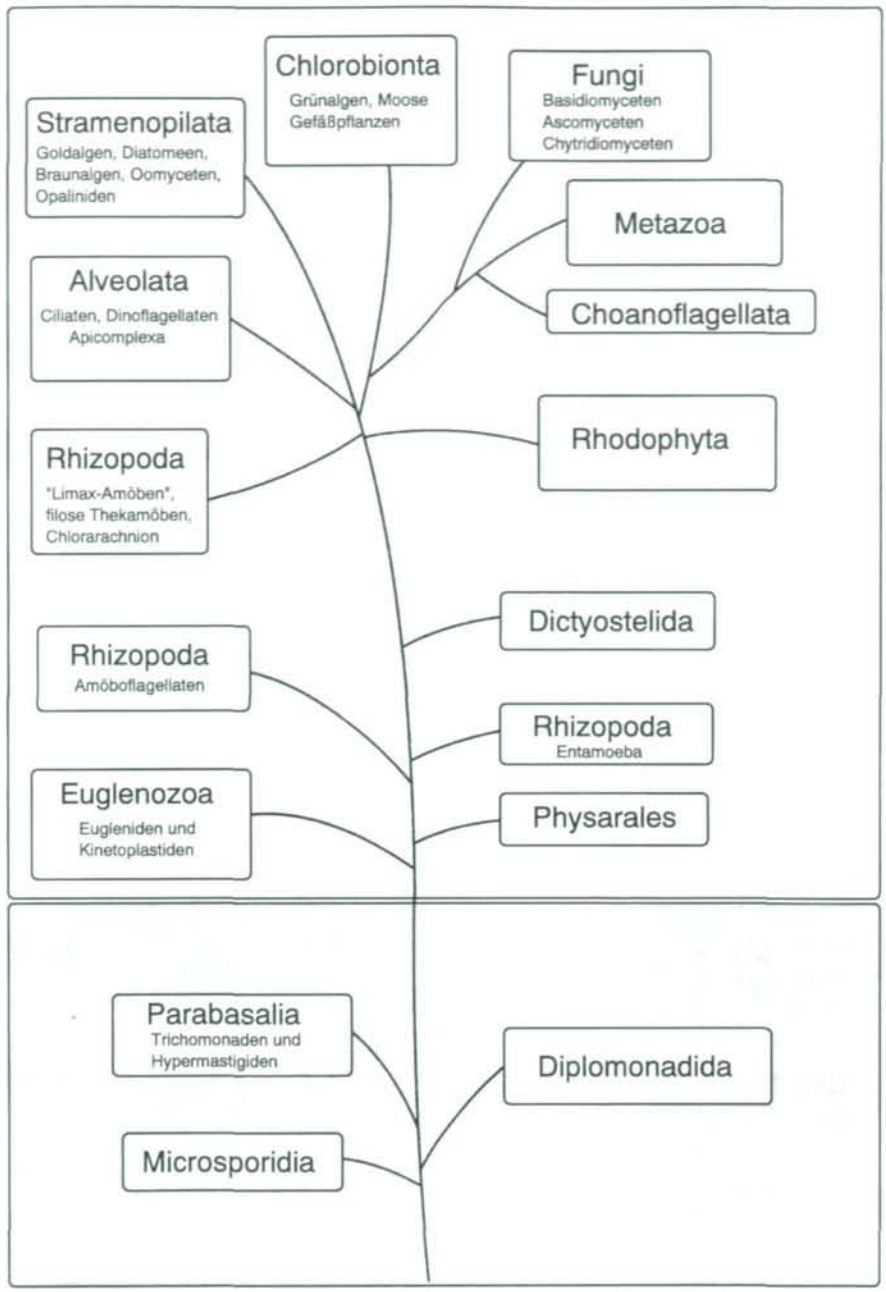


Abb. 2:
Dendrogramm der Eukaryoten, basierend auf Distanz-Matrix und Maximum Parsimony Bäumen der SSU-rRNA. Verändert und ergänzt nach LEIPE & HAUSMANN (1993).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

zudem nicht nachvollziehbare Gruppenbildungen auf (SIDDAL et al. 1996). So erscheinen die Cnidaria als paraphyletische Gruppe, wobei *Hydra* mit den Schwämmen näher verwandt erscheint, und die Myxozoa mit *Polypodium* in die Gruppe fallen, in der auch die triploblastischen Metazoa stehen.

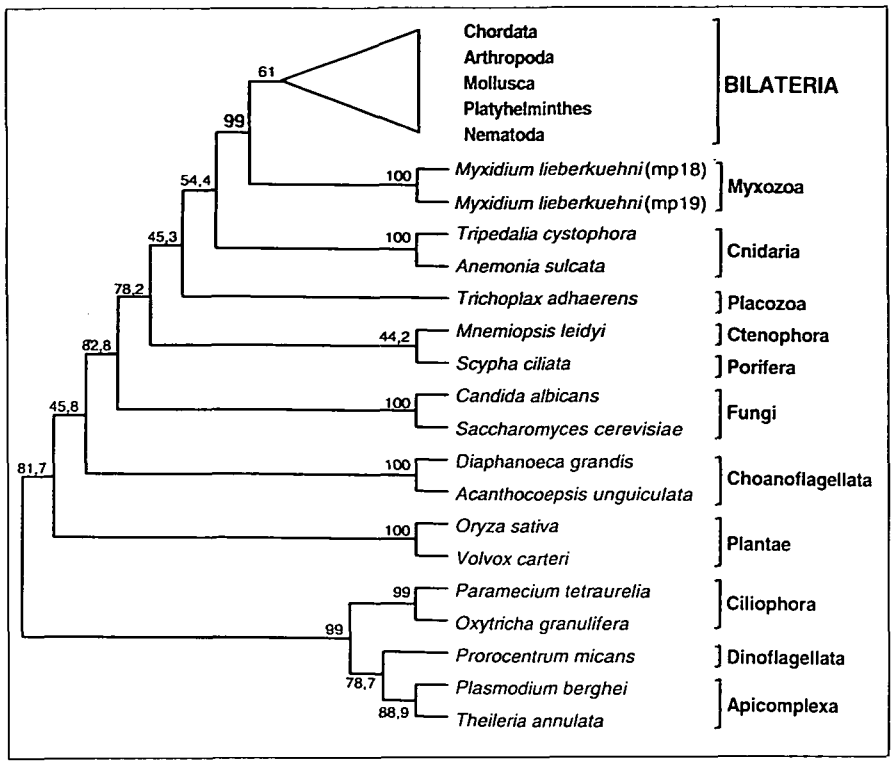


Abb. 3:
Stellung der Myxozoa im SSU-rRNA-Dendrogramm. Der Baum wurde nach der Maximum Parsimony Methode erstellt (FELSENSTEIN 1993). Verändert nach SCHLEGEL et. al. (1996).

In unserer Arbeitsgruppe (WYLEZICH et al., unveröffentlicht) wurde mit einem erweiterten Datensatz eine Sparsamkeits-Analyse durchgeführt, in der die mindestens notwendigen Mutationsschritte berechnet werden, um die verglichenen Sequenzen ineinander zu überführen. Dabei ergab sich ein sparsamster Baum mit 5392 Mutationen. Hierbei stehen die Myxozoa bei den tribloblastischen Bilateria und *Polypodium* bei den Cnidariern. In einem weiteren Schritt wurde ein Baum vorgegebenen, bei dem die Myxozoen zu den Cnidariern gestellt waren. Diese Gruppierung benötigte nur sechs Mutationsschritte mehr! Daraus ergibt sich für uns der Schluß, daß mit Hilfe der SSU-rDNA allein die exakte Stellung der Myxozoa im Stammbaum der Eukaryonten nicht sicher ermittelt werden kann, wenn auch ihre Zugehörigkeit zu den Metazoa wahrscheinlich ist. Weitere molekulare Merkmale müssen deshalb zur Klärung dieser Frage hergezogen werden.

Immerhin gelang es einer anderen Arbeitsgruppe, mit dem Vergleich ribosomaler Sequenzen eine spannende Frage zur Evolution innerhalb der Myxozoa mit zu klären. In den Lehrbüchern werden die Myxozoa in die Klassen Myxosporea (Fischparasiten) und Actinosporea (Oligochaten- und Sipunculidenparasiten) eingeteilt (LOM 1989). Komplette Lebenszyklen wurden, wenn überhaupt, nur sehr selten beobachtet. Nach einer Hypothese von WOLF & MARKIEV (1984), die sie aufgrund von Übertragungsstudien im Labor aufgestellt hatten, sollte es sich zumindest im Falle von *Myxobolus cerebralis* (Myxosporea) und *Triactinomyxon gyrosalmo* (Actinsporea) nicht um Vertreter verschiedener Klassen, sondern um verschiedene Stadien im Lebenszyklus ein und derselben Art handeln, die übrigens die wirtschaftlich bedeutende Drehkrankheit bei Salmoniden hervorruft. Diese Hypothese wurde unter anderem deshalb bezweifelt, weil sehr viel weniger Actinosporidier beschrieben sind (39 Arten), als Myxosporidier (ca. 1200 Arten). Eine Sequenzanalyse von *M. cerebralis* und *T. gyrosalmo* ergab jedoch eine Übereinstimmung von 99,8 %, die signifikant höher ist als zwischen Sequenzen verschiedener Arten der Gattung *Myxobolus* (ANDREE et al. 1997). Somit erhält die Hypothese, daß die verschiedenen Klassen der Myxozoa lediglich verschiedene Stadien in komplizierten Lebenszyklen sind, in denen zwei verschiedene Sporenstadien auftreten, massive Unterstützung.

4
Intertaxonische Rekombination

Neben den sogenannten primären intertaxonischen Rekombinationen (Aufnahme von Prokaryoten, die zu Mitochondrien und Plastiden wurden; SITTE 1991) kam es im Laufe der Eukaryotenevolution auch zu sekundären intertaxonischen Rekombinationen, wie dies bei *Euglena* schon angesprochen wurde. Bei verschiedenen Vertretern der Cryptomonaden, sowie der Chlorarachniophyta, sind die Reste des eukaryontischen Endobionten noch sichtbar. Sie besitzen ein ungewöhnliches Zellkompartiment, das den Chloroplasten und einen rudimentären Kern enthält,

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

das Nukleomorph. Die Plastiden von Chlorarachnion besitzen Chlorophyll a und b. Man würde deshalb einen einzelligen Vertreter der Grünalgen als Endobionten von Chlorarachnion annehmen. Die Cryptomonadenplastiden haben neben den Chlorophyllen a und c Phycobilline als akzessorische Pigmente, wie die Rotalgen, zu denen man deshalb eine nähere Verwandtschaft vermuten würde (GIBBS 1981). Die Analyse der Nucleomorph-SSU-rRNAs ergab jedoch zunächst keine sichere Aussage zur Herkunft der eukaryotischen Endobionten in diesen beiden Gruppen (DOUGLAS et al. 1991; MAIER et al. 1991; BHATTACHARYA et al. 1995). Erst eine verbesserte Methode zur Schätzung der Substitutionsraten (VAN DE PEER et al. 1996a) und die darauf erstellten Stammbäume bestätigten eine Gruppierung des *Chlorarachnion*-Nucleomorphs mit den Grünalgen und des Cryptomonaden-Nucleomorphs mit den Rotalgen (VAN DE PEER et al. 1996b; Abb. 4).

5 Grenzen der Methode bzw. des Informationsgehalts der SSU-rRNA

Es wurde bereits bei den mitochondrienlosen Taxa gezeigt, daß die rRNA-Daten die Aufzweigungsabfolgen nicht immer eindeutig wiedergeben. Eine Methode zur Überprüfung, wie gut ein Dendrogramm von dem zugrunde liegenden Datensatz unterstützt wird, ist das bootstrap-Verfahren (FELSENSTEIN 1985). Fälschlich wird dies immer wieder als ein statistisches Verfahren bezeichnet. Es wird aber nicht im statistischen Sinne ein Istwert mit einem Erwartungswert verglichen und die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet. Vielmehr handelt es sich um ein iteratives Verfahren, bei dem aus dem Datensatz zufällig Nukleotidpositionen zu einem wiederum gleich großen Datensatz ausgewählt werden. Dabei werden einige Positionen mehrfach repräsentiert, während andere fehlen. Wird eine Aufzweigung des Dendrogrammes durch viele Positionen unterstützt, wird diese bei wiederholten Tests häufig wiedergefunden. Sind es nur wenige, ergibt sich eine geringe Wiederfindungsrate. Selbst bei hohen bootstrap-Werten muß jedoch bedacht werden, daß diese über den Informationsgehalt des Datensatzes selbst noch keine Aussagen machen (FELSENSTEIN 1985).

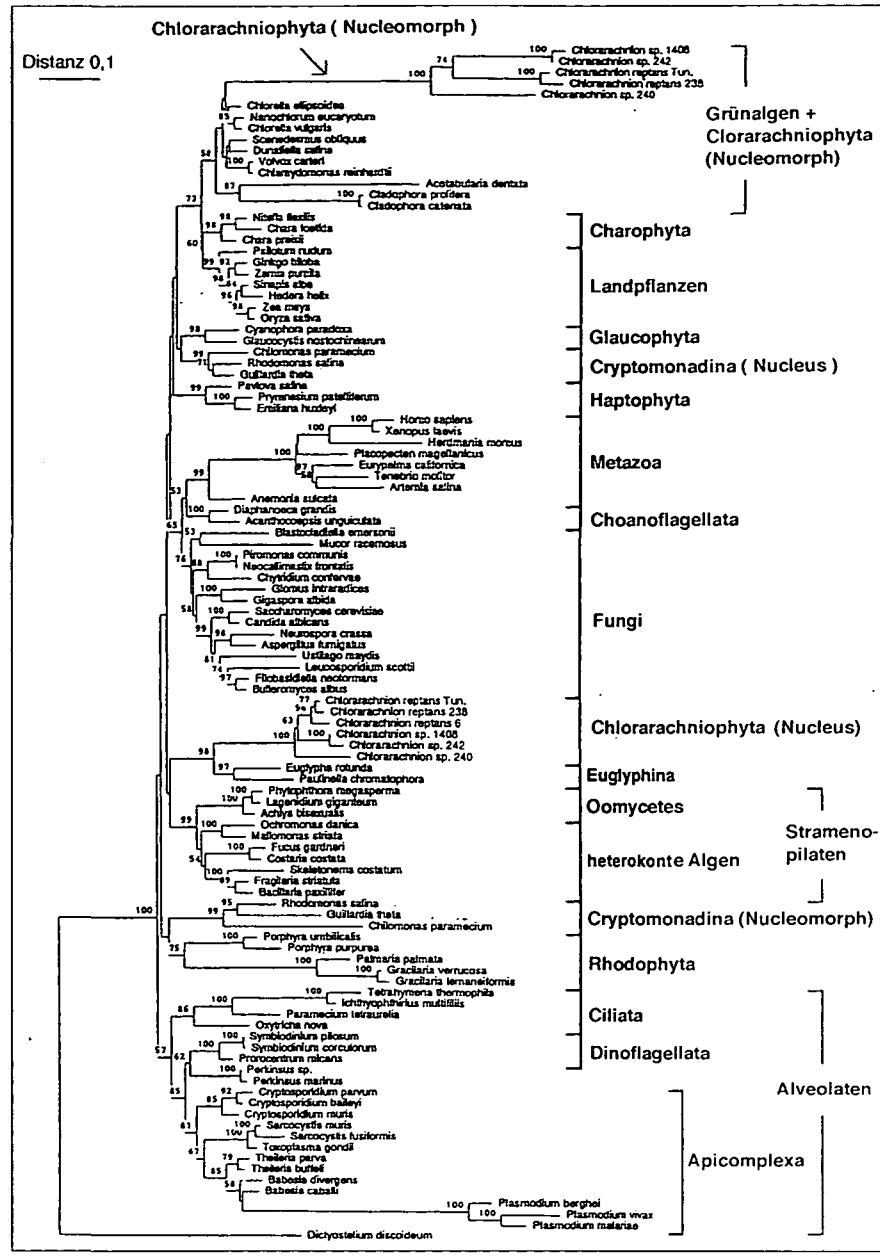
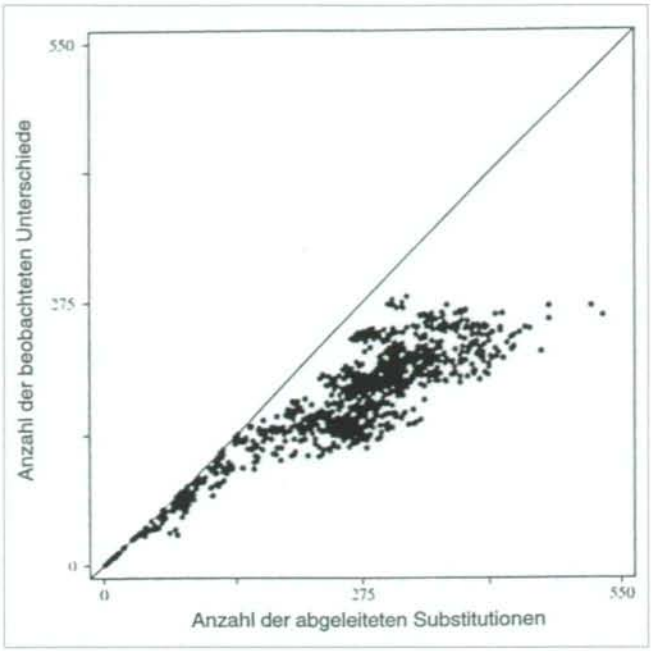


Abb 4: Stellung der Nucleomorph- und Kern-SSU-rRNA der Cryptomonadina und der Chlorachniophyta. Das Distanz-Matrix-Dendrogramm wurde mit der Neighbor-joining Methode erstellt. Verändert nach VAN DE PEER et al. (1996b).

Bei weitem nicht alle Aufzweigungen in den rRNA-Stammbäumen sind durch hohe bootstrap-Werte gekennzeichnet (Abb. 4). Ein Grund hierfür kann die Sättigung an vielen Nukleotidpositionen sein, d. h. bei schnell evolvierenden Sequenzen oder bei sehr lange getrennten Sequenzen treten zunehmend multiple Substitutionen auf.

Sättigung kann z. B. in einer Maximum Parsimony Analyse durch Vergleich der im Stammbaum errechneten Sequenzunterschiede mit den tatsächlich vorhandenen Unterschieden überprüft werden (PHILIPPE et al.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at



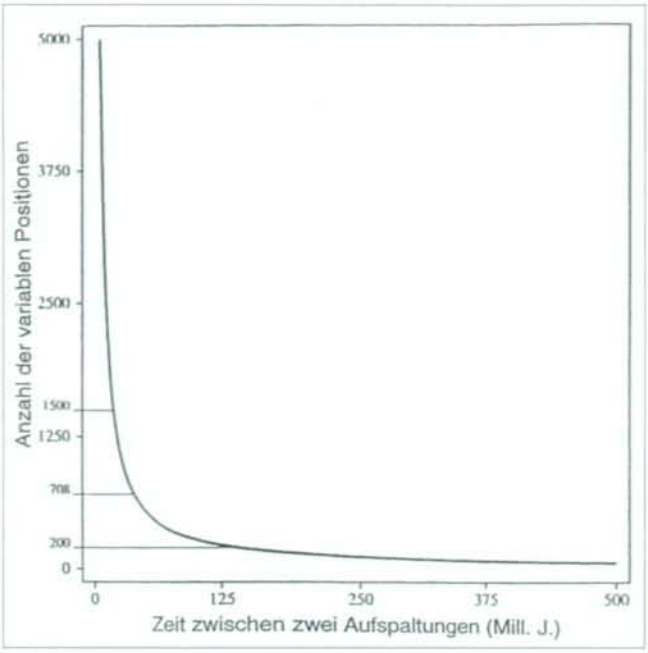


Abb. 5:
Vergleich von errechneten Substitutionen gegenüber den tatsächlich beobachteten Substitutionen. Aus PHILIPPE et al. (1994).

Abb. 6 (rechts):
Verhältnis zwischen der Zeit zweier Aufspaltungsereignisse und der Zahl der variablen Nukleotidpositionen, die benötigt werden, um für eine Aufzweigung eine 95%ige bootstrap-Unterstützung zu erhalten. Die Abschnitte in der Ordinate korrespondieren mit der Zahl informativer Positionen partieller 28S-rRNA (200), der kompletten SSU-rRNA (700) und der kompletten SSU + LSU-rRNA (1500). Aus PHILIPPE et al. (1994).

1994). Bei Sättigung nehmen tatsächliche Unterschiede gegenüber errechneten Unterschieden ab (Abb. 5).

Ein weitere Methode zur Erkennung von Sättigung oder Verrauschung von Datensätzen ist die Split-Zerlegung (BANDELT & DRESS 1992; BANDELT 1994). Bei Vorliegen vieler Merkmalswidersprüche nimmt dabei ein Diagramm keine Baumstruktur an, sondern erscheint vernetzt.

Von WAGELE wird zudem ein Verfahren vorgeschlagen, bei dem vor der Stammbaumkonstruktion eine Suche nach Apomorphien in Sequenzen homologer Gene durchgeführt wird (WAGELE 1996). Im Prinzip werden für ein potentielles Monophylum die Sequenzpositionen zusammengezählt, die ein anderes Nukleotid aufweisen als die Taxa der Außengruppe. Ein ähnliches Verfahren wurde von HENDY & PENNY (1993) und HENDY et al. (1994) veröffentlicht.

Eine Überprüfung der veröffentlichten Sequenzvergleiche mit Hilfe dieser Methoden erscheint dringend geboten, um vor allem die zwischen rRNA- und Proteindaten vorliegenden Widersprüche zu klären (siehe unten).

Wenn der vorliegende Datensatz nicht die Rekonstruktion der Aufzweigungsabfolge erlaubt, kann dies, wie bereits erwähnt, daran liegen, daß in der untersuchten Gruppe eine Radiation vorliegt, in der sich nicht genügend molekulare Apomorphien evolviert haben. Um weit zurückliegende Radiationen aufzulösen, braucht man sehr viel mehr Sequenzinformation als bei jungen Aufspaltungsereignissen, bei denen variable Regionen untersucht werden können, die noch nicht verrauscht sind. PHILIPPE et al. (1994) konnten zeigen, daß die Zahl der benötigten variablen Nukleotidpositionen in Abhängigkeit von den Aufspaltungsereignissen exponentiell ansteigt. Je kürzer die Aufspaltungen nacheinander erfolgten, desto mehr Sequenzinformation braucht man, um sie aufzulösen. Manche werden womöglich gar nicht aufgelöst werden können (Abb. 6).

Solche Radiationen sind nicht nur aus der Metazoen-Evolution bekannt. Es besteht der begründete Verdacht, daß auch bei einzelnen Protistenphyla solche Radiationen stattgefunden haben, wie z. B. bei den Ciliaten (BAROIN-TURANCHEAU et al. 1992; BERNHARD et al. 1995) und bei den Stramenopilaten (LEIPE et al. 1994). Es wurden daher bei der Rekonstruktion der Eukaryotenphylogenie Versuche unternommen, die SSU-rRNA und die LSU-rRNA zusammen auszuwerten, wobei ca. 5300 Positionen verglichen werden konnten (VAN DER AUWERA et al. 1995). Hierbei ergab sich z. B. eine deutlich höhere bootstrap-Unterstützung von 95 % für ein Schwestergruppenverhältnis der Alveolata und Stramenopilaten. Andere Aufzwei-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

gungen konnten jedoch auch mit dieser „verlängerten" Sequenz nicht aufgelöst werden.

5.1 Vergleich von proteincodierenden Genen

Der exponentielle Anstieg der benötigten Nukleotidpositionen ist vielleicht auch der Grund dafür, daß Vergleiche proteincodierender Gene bisher nicht den Durchbruch bei den durch die rRNA-Vergleiche ungelöst gebliebenen Fragen erbracht haben (LOOMIS & SMITH 1990; BHATTACHARYA et al. 1991; BALDAUF & PALMER 1993; HASEGAWA et al. 1993; RILEY & KRIEGER 1995; EDLIND et al. 1996). In etlichen Punkten gibt es übereinstimmende Topologien, wie z. B. in der Gruppierung von Metazoa und Fungi (BALDAUF & PALMER 1993; HASEGAWA et al. 1993; DOOLITTLE et al. 1996). In anderen Fragen widersprechen die Proteindaten den ribosomalen Daten. Dies betrifft besonders die Stellung von *Entamoeba histolytica* und *Dictyostelium discoideum* (Abb. 7). *Entamoeba histolytica* zweigt sehr früh in den Proteinstammbäumen ab, woraus einige Autoren schlossen, daß diese Art primär mitochondrienlos sei, und sie ihre Mitochondrien nicht sekundär verloren habe (HASEGAWA et al. 1993), wie man aufgrund der ribosomalen Daten annahm. Die Entdeckung mitochondrialer Sequenzen in *E. histolytica* (CLARK & ROGER 1995) spricht jedoch dafür, daß die ribosomalen Daten die Phylogenie richtig wiedergeben. Die Proteindaten sprechen weiterhin für ein viel späteres Abzweigen von *Dictyostelium* in der Eukaryontenevolution. In den Proteinstammbäumen sind jedoch in einigen Fällen gut charakterisierte Gruppen, wie z. B. die Ciliophora nicht monophyletisch (BHATTACHARYA et al. 1991; BALDAUF & PALMER 1993) und die Position von *Dictyostelium* nicht konstant (LOOMIS & SMITH 1990). Somit überzeugen auch in der Position von *Dictyostelium* die Proteinstammbäume weniger als die ribosomalen Daten. Hinzu kommt, daß zwar Sequenzen von vielen Proteinen (DOOLITTLE et al. 1996), aber von weit weniger Taxa vorliegen als ribosomale Daten. Die Proteindaten erlauben deshalb zur Zeit nur einen eingeschränkten Vergleich aus der Vielfalt der Protisten. Der gravierendste Unterschied ergibt sich derzeit in der Stellung der Microsporidier. Ganz im Gegensatz zu den ribosomalen Daten weisen die Sequenzvergleiche der a- und b-Tubulin-Gene auf eine nähere Verwandtschaft zu den Fungi (EDLIND et al. 1996; KEELING & DOOLITTLE 1996). Diese wäre eine plausible Erklärung, warum bei dem Mirosporidiern als einzigen unter den amitochondriaten Protisten ein synaptinemaler Komplex und somit Hinweise für den Ablauf einer Meiose gefunden wurde.

In den Tubulin-Genen sind jedoch nach Angabe der Autoren wenig informative Positionen enthalten, und die Ergebnisse werden auch entsprechend vorsichtig interpretiert. Zudem finden sich auch in diesen Stammbäumen nicht nachvollziehbare Gruppierungen.

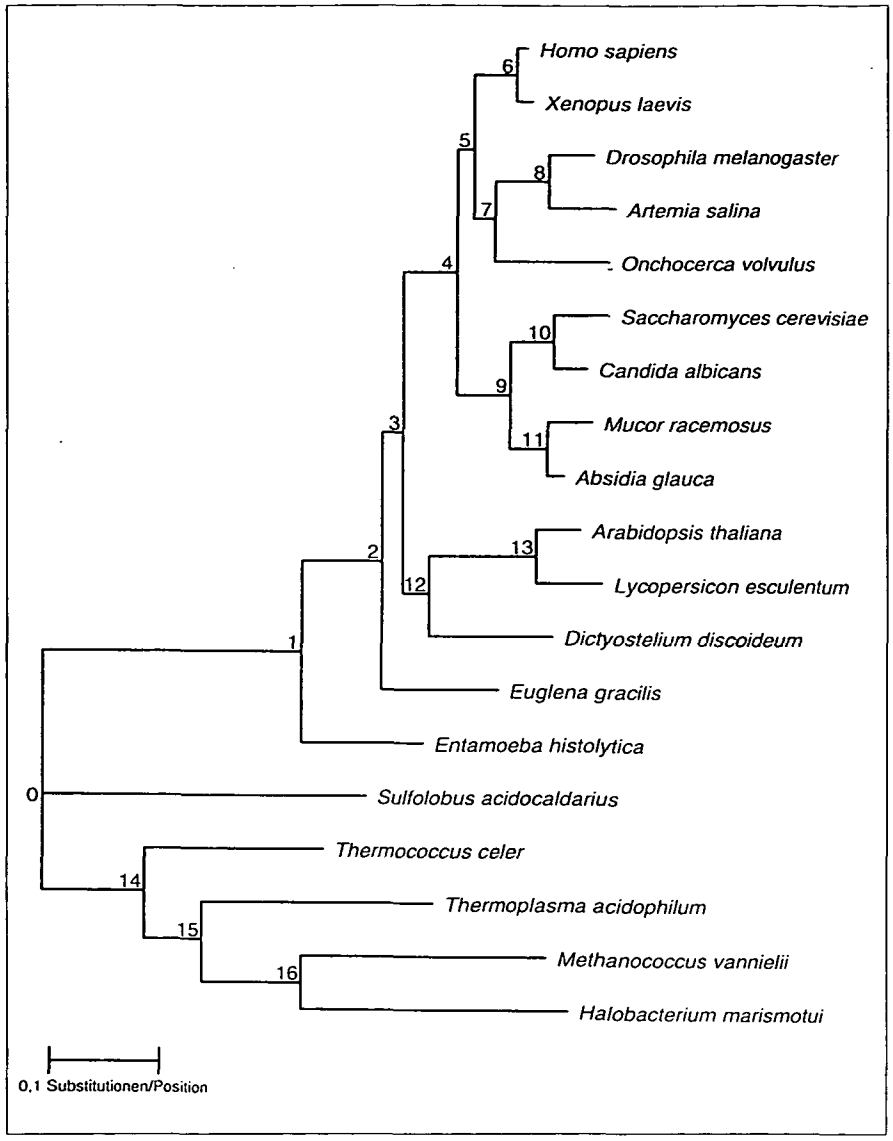


Abb 7: Maximum-Likelihood Dendrogramm basierend auf den Aminosäuresequenzen des Elongations-Faktor 1-a (Positionen 4 bis 429) von 14 Eukaryoten und 5 Archaebakterien-Sequenzen. Aus HASEGAWA et al. (1993).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

In einer Analyse des a-Tubulins sind die Grünalgen mit den Alveolaten näher verwandt als mit den Gefäßpflanzen, im b-Tubulin-Stammbaum sind die Ciliaten paraphyletisch (KEELING & DOOLITTLE 1996). Die Stellung von *Entamoeba histolytica* ist extrem unterschiedlich in den beiden b-Tubulin-Bäumen von EDLIND et al. (1996) und KEELING & DOOLITTLE (1996). Im einen Fall zweigt die Sequenz ganz an der Basis ab (EDLIND et al. 1996), während sie im anderen Fall „oben" im Stammbaum bei den Pilzen gruppiert (KEELING & DOOLITTLE 1996). Ein Grund für dieses derzeitige Durcheinander könnte in der Organisation proteincodierender Gene wie der Tubuline in Genfamilien liegen, die durch Genduplikationen entstanden sind. Durch den Vergleich paraloger Gene würden nicht die Unterschiede ermittelt, die sich seit der Aufspaltung der Taxa akkumuliert haben, sondern diejenigen, die sich seit der Genduplikation ereignet haben, wodurch stammesgeschichtliche Beziehungen falsch wiedergegeben werden.

Immerhin soll erwähnt werden, daß der Sequenzvergleich des Elongationsfaktor-Gens EF-1a wie die ribosomalen Daten für eine basale Stellung der Mirosporidier im Stammbaum der Protisten spricht (KAMAISHI et al. 1996).

```
                    20        30        40        50        60        70        80
                     *         *         *         *         *         *         *
Bleph.und. 4   KR-HRRVIRENIQGITKPAIRRLARRGGVKRLSGLVYDETRNVLKVFLEGVVRDAVTYTEHARRKTVTALDV
Bleph.und. 1   ..-.......................................................G...................
Bleph.und. 2   ..-.....................................D.................................
Bleph.spec.    ..-.......................................................................
Styl.lemnae    RH-TKKSLK.T.M.................I.S.I.E......RS...N.I..S......K.........
Oxytr. nova    RH-TKKSLK.T.M.................I.S.I.E......RS...N.I..S......K.........
Eu.euryst. 1   RH-TKKAF..T.L.V...............I.S...E...A...G...N.I..S......K.........
Eu.euryst. 4   RH-TKKAL..T.L.V...............I.S...E...A...G...N.I..S......K.........
Eu.minuta      RH-AKKTL..T.L.V...............I.S...E...A...G...S.I..S......K.........
Eu.vannus      RH-AKKAL..T.L.V...............I.S...E...A...G...S.I..S......K.........
Tetr.therm.    RH-S.KSNKAS.E.................I.SFI..DS.Q...S...N...................M..
Obertrumia 5   RN-KGKKEKPS.E.................I.SFI.ED......S...N...................M..
Obertrumia 6   RN-KGKKEKPS.E.................I.SFI.ED......N...N...................M..
Protocruzia    RHL.K..L..S...................I.Q.I........RS...N.....I.............M..
```

Abb. 8:
Vergleich einer Teilsequenz des Histon H4 Gens verschiedener Ciliaten. Als abgeleitete Merkmale interpretierbare Aminosäureaustausche sind eingerahmt. Vier Aminosäureaustausche können als Synapomorphien für die Stichotrichia (*Stylonychia lemnae, Oxytricha nova*) und Hypotrichia (*Euplotes eurystomus, E. minuta, E. vannus*) gedeutet werden (die Aminosäuren Threonin, T; Isoleucin, I; Serin, S; Lysin, K). Weiterhin sind eine Autapomorphie für die Stichotrichia (die Aminosäure Methionin in Position 29) und vier Autapomorphien für die Hypotrichia erkennbar (Leucin, L; Valin, V; Alanin, A; Glycin, G). Aus BERNHARD & SCHLEGEL (1998).

5.2 Analyse von qualitativen Merkmalen

Neben den gängigen Auswertemethoden wird bislang eher zurückhaltend nach qualitativen Merkmalen gesucht (z. B. Inversionen, Deletionen, Duplikationen, Anordnung von Genen), die als Apomorphien monophyletischer Gruppen gedeutet werden können. So fanden z. B. BALDAUF & PALMER (1993) bei Metazoa und Fungi eine Insertion von 12 Aminosäuren in einer hochkonservierten Region im Gen, das für den Elongationsfaktor EF 1-a codiert. Drei weitere Synapomorphien (zwei Deletionen und eine Insertion) wurden in der Enolase gefunden. Ein vielversprechender Kandidat für phylogenetische Untersuchungen bei verschiedenen Protistengruppen scheint das Histon H4 zu sein. Im Gegensatz zu den Metazoa findet man z. B. bei den Ciliaten (BERNHARD & SCHLEGEL 1995), bei *Trichomonas* (MARINETS et al. 1996) und bei *Trypanosoma* (BENDER et al. 1992) viele Sequenzunterschiede. Bei den Ciliaten können diese mühelos phylogenetisch interpretiert werden (BERNHARD & SCHLEGEL 1998; Abb. 8).

Die evolutiven Veränderungen in der Anordnung mitochondrialer Gene könnten in der Zukunft einen weiteren, phylogenetisch auswertbaren Merkmalskomplex darstellen. Bei den Metazoa sind bereits 35 komplette mitochondriale Genome untersucht und wurden z. T. schon für stammesgeschichtliche Fragen analysiert (JANKE et al. 1994). Auch bei den Protisten erscheint dieser Ansatz bei den Gruppen, die Mitochondrien besitzen sinnvoll, da die Ansicht immer mehr Anhänger findet, daß Mitochondrien homolog sind. Es sind jedoch erst wenige mitochondriale Genome untersucht. Zudem muß bei entsprechenden Analysen immer an sekundäre

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Endocytobiosen und an die Möglichkeit gedacht werden, daß das untersuchte Mitochondriengenom nicht aus der Wirtszelle, sondern aus dem eukaryotischen Endobionten stammt. Von etlichen Protisten werden zudem bereits die kompletten Genome untersucht (*Microsporidium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*).

Im Zuge der zunehmenden automatisierten DNA-Sequenzierung wird das Datenmaterial rapide anwachsen und zusammen mit den verbesserten, phylogenetischen Auswertungsmethoden weitere schlüssige Erkenntnisse zu unserem immer noch sehr unvollständigen Bild der Eukaryotenphylogenie erbringen.

6 Zusammenfassung

Molekulare Merkmale gewinnen zunehmend an Bedeutung in der biologischen Systematik. Zur Rekonstruktion stammesgeschichtlicher Beziehungen wird am häufigsten die ribosomale RNA der kleinen Ribosomenuntereinheit („small subunit rRNA", SSU-rRNA), beziehungsweise deren codierende Region (SSU-rDNA) verglichen. In den davon abgeleiteten Stammbäumen der Eukaryoten zweigen als erste mitochondrienlose Taxa ab (Mikrosporidier, Diplomonaden und Parabasalia). Später im Stammbaum zweigen die Euglenozoa, Heterolobosa (Amöboflagellaten) und Dictyostelida ab. Dann kommt es zu einer raschen Abfolge von Aufzweigungen, die zu den Rotalgen, Chlorobionten (Grünalgen, Moosen und Gefäßpflanzen), Fungi, Metazoa und Choanoflagellata führt. Weiterhin gruppieren in dieser „Radiation" die Stramenopilaten (Oomyceten, Hyphochitriomyceten und heterokonte Algen), Alveolaten (Ciliaten, Dinoflagellaten und Apicomplexa), Cryptomonaden und Teile der „Amöben" (Limaxamöben, filose Amöben). Die parasitischen Myxozoa zweigen innerhalb der Metazoa ab. Eine aufgrund ultrastrukturelle Übereinstimmungen vermutete nähere Verwandtschaft zu den Nesseltieren läßt sich jedoch aus den Sequenzdaten nicht ableiten.

Sequenzvergleiche proteincodierender Gene unterstützen ein Schwestergruppenverhältnis von Metazoen und „höheren" Pilzen. Widersprüche zwischen Proteinsequenz- und SSU-rDNA-Stammbäumen ergeben sich jedoch in der Stellung von *Entamoeba histolytica* und *Dictyostelium discoideum*, sowie neuerdings in der Stellung der Microsporidier. Die Analyse verschiedener Proteingene führt jedoch ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. a- und b-Tubulingene sprechen für eine nähere Verwandtschaft zu den Pilzen, während die Sequenzvergleiche eines Elongationsfaktor-Gens (EF-1a) die ribosomalen Daten unterstützen. Diese widersprüchlichen Befunde könnten ihre Ursache in extrem unterschiedlichen Evolutionsraten homologer Gene in verschiedenen Linien haben. Besonders parasitische Taxa weisen häufig hohe Substitutionsraten auf, die zu falschen Gruppierungen führen können. Ein weiterer Grund wären kurze Zeitabstände, in denen die Aufspaltungsereignisse stattgefunden haben (Radiationen). In diesen Abständen könnten in den bislang untersuchten Molekülen nicht genügend molekulare Apomorphien evolviert sein, um diese Ereignisse verläßlich rekonstruieren zu können. Je kürzer die Abfolgen der Aufspaltungsereignisse sind, um so mehr variable Nukleotidpositionen werden benötigt, um diese aufzulösen.

Bei den Sequenzvergleichen sollte weiterhin qualitativen Merkmalsanalysen (Veränderungen in der Genanordnung, Insertionen, Deletionen, Duplikationen u. a.) mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Als Beispiel werden die Merkmalsunterschiede in den Histon H4 Genen der Ciliaten phylogenetisch interpretiert.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

7
Literatur

ANDREE K.B., GRESOVIAC S.J. & R.P. HEDRICK (1997): Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling desease in salmonid fish. — J. Euk. Microbiol. **44**: 208-215.

BALDAUF S.L. & J.D. PALMER (1993): Animals and fungi are each other's closest relatives: Congruent evidence from multiple proteins. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 1158-1162.

BANDELT H.J. (1994): Phylogenetic networks. — Verh. naturwiss. Ver. Hamburg **34**: 51-71.

BANDELT H. J. & A.W. DRESS (1992): Split decomposition: A new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. — Mol. Phyl. Evol. **1**: 242-252.

BAROIN-TURANCHEAU A., DELGADO P., PERASSO R. & A. ADOUTTE (1992): A broad phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 9764-9768.

BENDER K., BETSCHART B., SCHALLER J., KÄMPFER U. & H. HECKER (1992): Sequence differences between histones of procyclic *Trypanosoma brucei brucei* and higher eurkaryotes. — Parasitology **105**: 97-104.

BERNHARD D. & M. SCHLEGEL (1998): Evolution of histone H4 and H3 genes in different ciliate lineages. — J. Mol. Evol. **46**: 344-354.

BERNHARD D., LEIPE D.D., SOGIN M.L. & K.M. SCHLEGEL (1995): Phylogenetic relationships of the Nassulida within the phylum Ciliophora inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Furgasonia blochmanni*, *Obertrumia georgiana*, and *Pseudomicrothorax dubius*. — J. Euk. Microbiol. **42**: 126-131.

BHATTACHARYA D., STICKEL S.K. & M.L. SOGIN (1991): Molecular phylogenetic analysis of actin genic regions from *Achlya bisexualis* (Oomycota) and *Costaria costata* (Chromophyta). — J. Mol. Evol. **33**: 525-536.

BHATTACHARYA D., HELMCHEN T. & M. MELKONIAN (1995): Molecular evolutionary analysis of nulear-encoded small subunit ribosomal RNA identify an independent rhizopod lineage containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. — J. Euk. Microbiol. **42**: 65-69.

BUI E. T. M., BRADLEY P.J. & P.J. JOHNSON (1996): A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 9651-9656.

CAVALIER-SMITH T. (1992): The number of symbiotic origins of organelles. — BioSystems **28**: 91-106.

CAVALIER-SMITH T. (1993): Kingdom protozoa and its 18 phyla. — Microbiol. Rev. **57**: 953-994.

CAVALIER-SMITH T. & E.E. CHAO (1997): Sarcomonad ribosomal RNA sequences, rhizopod phylogeny, and the origin of euglyphid amoebae. — Arch. Protistenk. **147**: 227-236.

CLARK C.G. & A.J. ROGER (1995): Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 6518-6521.

DE RIJK P., VAN DE PEER Y., VAN DEN BROECK I. & R. DE WACHTER (1995): Evolution according to large ribosomal subunit RNA. — J. Mol. Evol. **41**: 366-375.

DOOLITTLE R.F., FENG D.F., TSANG S., CHO G. & E. LITTLE (1996): Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. — Science **271**: 470-477.

DOUGLAS S.E., MURPHY C.A., SPENCER D.F. & M.W. GRAY (1991): Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. — Nature **350**: 148-151.

EDLIND T.D., LI J., VISVESVARA G.S., VODKIN M.H., MCLAUGHLIN G.L. & S.K. KATYAR (1996): Phylogenetic analysis of ß-Tubulin sequences from amitochondrial protozoa. — Molec. Phylogen. Evol. **5**: 359-367.

ELWOOD H.J., OLSEN G.J. & M.L. SOGIN (1985): The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. — Mol. Biol. Evol. **2**: 399-410.

FELSENSTEIN J. (1978): Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. — Syst. Zool. **27**: 401-410.

FELSENSTEIN J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. — Evolution **39**: 783-791.

FELSENSTEIN J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5. — Department of Genetics, Univ. Washington, Seattle.

GIBBS S.P. (1981): The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiontic algae. — Ann. N. Y. Acad. Sci. **361**: 193-208.

HAECKEL E. (1866): Generelle Morphologie der Organismen. — Reimer, Berlin.

HAECKEL E. (1904): Kunstformen der Natur. — Bibliograph. Inst., Leipzig, Wien.
(Die ersten Tafeln sind 1899 erschienen, weitere zwischen 1899 und 1904; vollständig lag das Werk aber erst 1904 vor.)

HASEGAWA M., HASHIMOTO T., ADACHI J., IWABE N. & T. MIYATA (1993): Early branchings in the evolution of eukaryotes: Ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. — J. Mol. Evol. **36**: 380-388.

HAUSMANN K. & N. HÜLSMANN (1996a): Protozoology. — Thieme, Stuttgart, New. York.

HAUSMANN K. & N. HÜLSMANN (1996b): „Einzellige Eukaryota", Einzeller. — In: WESTHEIDE W. & R. RIEGER (Hrsg.): Spezielle Zoologie. G. Fischer, Stuttgart, Jena, New York, pp. 19-71.

HENDY M. D. & D. PENNY (1993): Spectral analysis of phylogenetic data. — J. Classific. **10**: 5-24.

HENDY M.D., PENNY D. & M.A. STEEL (1994): A discrete FOURIER analysis for evolutionary trees. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 3339-3343.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

HÜLSMANN N. & K. HAUSMANN (1994): Towards a new perspective in protozoan evolution. — Europ. J. Protistol. **30**: 365-371.

INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J. & T.J. WHITE (Eds.): PCR protocols. A guide to methods and appplications. — Academic Press, San Diego.

JANKE A., FELDMAIER-FUCHS G., THOMAS W.K., HAESELER A. & S. PÄÄBO (1994): The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. — Genetics **137**: 243-256.

JEFFERIES R.P.S. (1980): Zur Fossilgeschichte des Ursprungs der Chordaten und der Echionodermen. — Zool. Jahrb. Anat. **103**: 285-353.

KAMAISHI T., HASHIMOTO T., NAKAMURA Y., NAKAMURA F., MURATA S., OKADA N., OKAMOTO K.-I., SHIMIZU M. & M. HASEGAWA (1996): Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1a suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes. — J. Mol. Evol. **42**: 257-263.

KEELING P.J. & W.F. DOOLITTLE (1996): Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. — Mol. Biol. Evol. **13**: 1297-1305.

LEIPE D.D. & K. HAUSMANN (1993): Neue Erkenntnisse zur Stammesgeschichte der Eukaryoten. — Biol. uns. Zeit **23**: 178-183.

LEIPE D.D., GUNDERSON J.H., NERAD T.A. & M.L. SOGIN (1993): Small subunit ribosomal RNA of *Hexamita inflata* and the quest fot the first branch in the eukaryotic tree. — Mol. Biochem. Parasitol. **59**: 41-48.

LEIPE D.D., WAINRIGHT P.O., GUNDERSON J.H., PORTER D., PATTERSON D.J., VALOIS F., HIMMERICH S. & M.L. SOGIN (1994): The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. — Phycologia **33**: 369-377.

LOM J. (1989): Phylum Myxozoa. — In: MARGULIS L., CORLISS J. O., MELKONIAN M. & CHAPMAN D.J. (Eds.): Handbook of Protoctista. Jones & Bartlett Publishers, Boston, pp. 36-52.

LOOMIS W.F. & D.W. SMITH (1990): Molecular phylogeny of *Dictyostelium discoideum* by protein sequence comparison. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 9093-9097.

MAIER U.G., HOFMANN C.J.B., ESCHBACH S., WOLTERS J. & G.L. IGLOI (1991): Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. — Mol. Gen. Genet. **230**: 155-160.

MARGULIS L., CORLISS J.O., MELKONIAN M. & D.J. CHAPMAN (Eds.) (1989): Handbook of Protoctista. — Jones & Bartlett Publishers, Boston.

MARINETS A., MÜLLER M., JOHNSON P.J., KULDA J., SCHEINER O., WIEDERMANN G. & M. DUCHENE (1996): The sequence and organization of the core histone H3 and H4 genes in the early branchinig amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. — J. Mol. Evol **43**: 563-571.

MÜLLER M. (1993): The hydrogenosome. — J. Gen. Microbiol. **139**: 2879-2889.

PATTERSON D.J. (1989): Stramenopiles: chromophytes from a protistan perspective. — In: GREEN J.C., LEADBETTER B.S.C. & W.L. DIVER (Eds.): The chromophyte algae: Problems and perspecives. — Syst. Ass. Spec. Vol. **38**, Clarendon Press, Oxford, pp. 357-379.

PAWLOWSKI J., BOLIVAR I., GUIARD-MAFFIA J. & M. GOUY (1994): Phylogenetic position of Foraminifera inferred from LSU-rRNA gene sequences. — Mol. Biol. Evol. **11**: 929-938.

PHILIPPE H., CHENUIL A. & A. ADOUTTE (1994): Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? — Development, Suppl.: 15-24.

RAGAN M.A. & D.J. CHAPMAN (1978): A biochemical phylogeny of protists. — Academic Press, New York.

RILEY D.E. & J.N. KRIEGER (1995): Molecular and phylogenetic analysis of PCR-amplified cyclin-dependent kinase (CDK) family sequences from representatives of the earliest available lineages of eukaryotes. — J. Mol. Evol. **41**: 407-413.

ROTHSCHILD L.J. & P. HEYWOOD (1987): Protistan phylogeny and chloroplast evolution: conflicts and congruence. — Progr. Protistol. **2**: 1-68.

SCHLEGEL M., LOM J., STECHMANN A., BERNHARD D., LEIPE D., DYCOVA I. & M.L. SOGIN (1996): Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that myxozoa are metazoa and related to the bilateria. — Arch. Protistenk. **147**: 1-9.

SIDDAL M., MARTIN D.S., BRIDGE D., DESSER S.S. & D.K. CONE (1996): The demise of a phylum of protists: Phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. — J. Parasitol. **81**: 961-967.

SITTE P. (1991): Die Zelle in der Evolution des Lebens. — Biol. uns. Zeit **21**: 85-92.

SMOTHERS J.F., DOHLEN C.D., VON SMITH L.H.J. & R.D. SPALL (1994): Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. — Science **265**: 1719-1721.

SOGIN M.L. (1991): Early evolution and the origin of eukaryotes. — Curr. Op. Gent. Devel. **1**: 547-463.

SUDHAUS W. & K. REHFELD (1992): Einführung in die Phylogenetik und Systematik. — G. Fischer, Stuttgart, Jena, New York.

TAYLOR F.J.R. (1976): Flagellate phylogeny: A study in conflicts. — J. Protozool. **23**: 28-40.

VAN DE PEER Y., NEEFS J.M., DE RIJK P. & R. DE WACHTER (1993): Evolution of eukaryotes as deduced from small ribosomal subunit RNA. — Biochem. Syst. Ecol. **21**: 43-55.

VAN DE PEER Y., VAN DER AUWERA G. & R. DE WACHTER (1996a): The evolution of stramenopiles and alveolates as derived by „substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA. — J. Mol. Evol. **42**: 401-210.

VAN DE PEER Y., RENSING S.A., MAIER U.-G. & R. DE WACHTER (1996b): Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 7732-7736.

VAN DER AUWERA G., DE BAERE R., VAN DE PEER Y., DE RIJK P., VAN DEN BROECK I. & R. DE WACHTER (1995): The phylogeny of the Hyphochytriomycota as deduced from ribosomal RNA sequences of *Hyphochytrium catenoides*. — Mol. Biol. Evol. **12**: 671-678.

VOSSBRINCK C.R. & C.R. WOESE (1986): Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. — Nature **320**: 287-288.

VOSSBRINCK C.R., MADDOX J.V., FRIEDMANN S., DEBRUNNER-VOSSBRINK B.A. & C.R. WOESE (1987): Ribosomal RNA sequence suggests Microsporidia are extremely ancient eukaryotes. — Nature **326**: 411-414.

WÄGELE J.-W. (1996): First principles of phylogenetic systematics, a basis for numerical methods used for morphological and molecular characters. — Vie Milieu **46**: 125-138.

WAINRIGHT P.O., HINKLE G., SOGIN M.L. & S.K. STICKEL (1993): Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. — Science **260**: 340-342.

WOLF K. & M.E. MARKIEW (1984): Biology contravene-staxonomy in the Myxozoa: New discoveries show alteration of invertebrate and vertebrate hosts. — Science **225**: 1449-1452.

WOLTERS J. (1991): The troublesome parasites – molecular and morphological evidence that Apicomplexa belong to the dinoflagellate-ciliate clade. — BioSystems **25**: 75-83.

Anschrift des Verfassers:
Univ.-Prof. Dr. Martin SCHLEGEL
Institut für Zoologie/Spezielle Zoologie
Universität Leipzig
Talstraße 33
D-04103 Leipzig
Deutschland